

УДК 582.32:581.5

## ЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ НІКЕЛЮ В КЛІТИНАХ ГАМЕТОФІТУ МОХУ *FUNARIA HYGROMETRICA* HEDW.

У. Оксенюк, О. Лобачевська

Інститут екології Карпат НАН України  
вул. Стефаника, 11, Львів 79000, Україна  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

Досліджено вплив іонів нікелю на регенераційну здатність листків моху *Funaria hygrometrica* Hedw. з різних місцезростань. Встановлено, що з підвищенням концентрації металу в середовищі пригнічувався розвиток регенерантів та знижувалася швидкість їх росту. На підставі результатів цитохімічного визначення  $Ni^{2+}$  виявлено особливості його поглинання і локалізації в клітинах листків моху після інкубації в 30, 100, 1000 мкМ розчинах сульфату нікелю та регенерації на агаризованому середовищі з відповідними концентраціями металу.

*Ключові слова:* нікель, диметилглюксим, листок, цитоплазма, вакуоль, мох *Funaria hygrometrica*.

Техногенне забруднення довкілля викидами автомобільного транспорту внаслідок емісії промислових підприємств і відвалів рудників та внесення підвищених доз органічних і мінеральних добрив, пестицидів призводить до формування нових геохімічних аномалій регіонального характеру. Підвищення рівня забруднення ґрунтів важкими металами спричиняє зростання їх вмісту у рослинах і тваринах, що може призвести до серйозних змін довкілля. У ході еволюції рослини виробили здатність поглинати не лише необхідні елементи живлення, а й ті, біологічна функція яких є невідомою.

Із розвитком індустріальної діяльності частка нікелю у навколишньому середовищі постійно зростає. Його токсичність для живих організмів часто пов'язана зі серпентиновими ґрунтами [16] і проявляється у вигляді хлорозу й інгібування росту та розвитку рослин [11]. Встановлено [14, 24], що нікель є ультрамікроелементом, який входить до активного центру уреазу – ферменту, що каталізує гідролітичне розкладання сечовини. Показано, що активність ферменту у присутності  $Ni^{2+}$  підвищувалася в коренях і листках *Brassica napus* L. [17], а також у насінні [15, 26] та листках *Glycine max* (L.) Merr. [13]. Крім того, виявлено, що рослини ячменю не закінчують свій життєвий цикл за відсутності нікелю і що він не може бути замінений жодним іншим елементом [12]. Деякими авторами встановлено [1], що нікель у низьких концентраціях активує, окрім уреазу і гідрогенази [13, 14, 17], низку інших ферментів, проте механізми цих процесів поки що мало досліджені.

Вплив важких металів на ріст і розвиток мохів проаналізовано значно слабше, ніж його дію на квіткові рослини. Мохи відрізняються від квіткових рослин тим, що під час адаптації до змінених умов природного середовища виявляють високий рівень фенотипної мінливості, тоді як генетична мінливість залишається низькою [23]. Мохи як безсудинні рослини, на відміну від інших представників вищих рослин, поглинають мінеральні речовини всією поверхнею, завдяки чому нагромаджують поллютанти, у тому числі важкі метали, у підвищених концентраціях. Ювенільна стадія розвитку гаметофіта – протонема – першою апробує здатність моху проростати на середовищах із металами. Одношаровість багатьох органів гаметофіта дає можливість досліджувати ці процеси і кількісно визначати рівень акумуляції металів у окремих клітинах, тому мохи успішно використовують для біоіндикації.

На сьогодні залишаються недостатньо вивченими механізми і кінетика поглинання  $Ni^{2+}$ , його розподіл у тканинах рослин та фізіологічні бар'єри обмеження надходження металу в органи. Встановлено [6], що кількість видів-гіперакумуляторів нікелю набагато чисельніша порівняно з іншими важкими металами. Понад 300 видів із різних родин: Euphorbiaceae, Brassicaceae, Asteraceae, Flacourtiaceae, Vixaceae, Rubiaceae здатні нагромаджувати в пагонах більше 1 г нікелю на 1 кг сухої маси [22], проте досі не з'ясована природа гіперакумуляції та механізми стійкості таких рослин до токсичної дії надлишку металу.

З огляду на це метою нашої роботи було дослідити токсичний вплив нікелю на ріст і розвиток регенерантів моху *Funaria hygrometrica* Hedw., цитохімічно визначити іони металу у клітинах та з'ясувати особливості їх поглинання і розподілу в клітинах гаметофіта.

Для дослідження використовували широко розповсюджений вид моху *F. hygrometrica*, який збирали з техногенно порушених екотопів із різним рівнем забруднення важкими металами, а саме поблизу головних автомагістралей м. Львова та з території шахтних відвалів м. Червонограда. Для контролю використовували зразки моху, зібрані на території заповідника „Розточчя”.

Досліджували токсичний вплив нікелю на регенеративну здатність листків і швидкість росту регенерантів на агаризованому середовищі Кнопа [18] із додаванням різних концентрацій (30, 100 і 1000 мкМ) сульфату нікелю. Вирощували зразки моху в контрольованих умовах температури (20–22,5°C), освітлення (2,0–2,2 тис. лк), відносної вологості (90–95%) та 16-годинному фотоперіоді.

Загальну довжину регенеративної протонеми визначали на 7, 10 та 14-й день на середовищі з концентрацією 30 мкМ  $Ni^{2+}$  і на 14, 17 і 33-й день на середовищі зі 100 мкМ  $Ni^{2+}$ . Виміри проводили під мікроскопом JENAVAL при збільшенні 12,5<sup>x</sup> безпосередньо у чашках Петрі, не порушуючи стерильності культури. Швидкість росту регенерантів визначали як частку від ділення приросту довжини регенеративної протонеми на тривалість росту. Для встановлення рівня стійкості рослин моху до нікелю використовували індекс толерантності як співвідношення кількості листків, що прорегенерували за наявності металу, до кількості прорегенерованих листків у контролі, визначений у %.

Особливості розподілу іонів нікелю та місця їх локалізації у клітинах гаметофіта досліджували в пагонах та ізольованих листках *F. hygrometrica*, які протягом 7 і 30 днів вирощували на агаризованому середовищі або інкубували у розчинах із різними концентраціями (30, 100 та 1000 мкМ)  $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ . Для гістохімічного виявлення  $Ni^{2+}$  у клітинах використовували диметилглюксим, який, проявляючи високу чутливість до іонів металу, утворював забарвлений у червоно-бурий колір комплекс – диметилглюксимін нікелю [7]. Найінтенсивніше забарвлення з'являлося майже відразу після додавання диметилглюксиму і не змінювалося протягом 20 хв. Для приготування барвника, що є двоосновною кислотою, яка утворює солі у лужних розчинах, використовували 1%-ний розчин диметилглюксиму в 1,5%-му розчині NaOH, який готували на 0,05 М розчині бури ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ), рН 9,8–10,4. Барвник диметилглюксим не призводив до деструкції тканин, його зберігали протягом тижня. Чутливість реакції визначали крапельним методом: на предметне скло наносили краплю розчину сульфату нікелю і диметилглюксиму.

Для оцінки інтенсивності поглинання металу пагони й ізольовані листочки моху зі середовищ із різними концентраціями металу переносили у краплю барвника на предметному скельці. Про наявність  $Ni^{2+}$  у клітинах судили за інтенсивністю забарвлення клітин від світло-рожевого до червоно-бурого кольору. Забарвлення клітин органів *F. hygrometrica* змінювалося залежно від концентрації металу: зі збільшенням концентрації металу колір набував інтенсивнішого червоно-бурого забарвлення.

Інтенсивність поглинання  $\text{Ni}^{2+}$  клітинами листків моху досліджували цитофотометрично при довжині хвилі 520 нм. Для цього попередньо визначали екстинкцію поглинання диметилглюксиміну нікелю. Спектр поглинання комплексу аналізували у краплях 1 мМ розчину сульфату нікелю, зафарбованих барвником (рис. 1). За такої концентрації нікель найкраще зв'язувався з барвником і проявляв відповідний спектр поглинання світла. Крива поглинання комплексу диметилглюксиміну нікелю була зміщена в область із максимумом 520 нм (рис. 1).

Кожен дослід повторювали тричі. Результати опрацьовували статистично [10].

Важливою особливістю, яка зумовлює високу інтенсивність вегетативного поновлення мохів, є здатність усіх органів цих рослин, їх тканин, навіть окремих клітин гаметофіту чи спорофіту до регенерації. Ізольовані листки *F. hygrometrica* в умовах лабораторної культури поновлювалися виключно вторинною протоневою. Регенеранти утворювалися переважно з клітин листової пластинки і жилки. Вторинна протонева розросталася і морфологічно диференціювалася в гаметофори.

На підставі аналізу результатів регенерації ізольованих листків гаметофорів, зібраних на території шахтних відвалів м. Червонограда, у центральній частині м. Львова та заповідника, на агаризованому середовищі із концентрацією 30 мкМ  $\text{Ni}^{2+}$  встановлено незначне зниження регенераційної здатності порівняно з контролем (табл. 1). Під час вирощування *F. hygrometrica* з Червонограда спостерігали утворення різноманітних морфозів і деформації листків (вип'ячування з великих клітин, скручування, хвилясті та нерівні краї листової пластинки) на молодих гаметофорах протягом 1 місяця росту культури. Таких змін на регенеративних гаметофорах не відзначали у моху з інших місцезростань.

Раніше встановлено [3], що іони нікелю пригнічували ріст і розвиток протонеми зі спор *F. hygrometrica* внаслідок гальмування поділу клітин і галуження хлоронеми, а також спричиняли викривлення, згини та скручування протонемних ниток. Високі концентрації нікелю пригнічували апікальний ріст гаметофорів у результаті відмирання

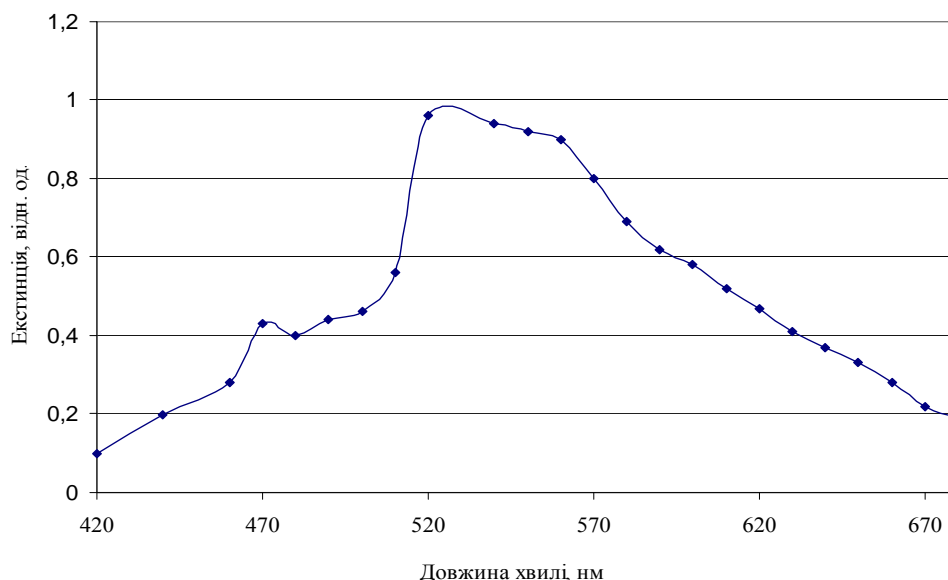


Рис. 1. Спектр поглинання комплексу диметилглюксиміну нікелю.

його апексу й ініціації додаткових бруньок по всьому стеблу, особливо у його верхівці. Виявлені морфологічні зміни на різних стадіях розвитку моху, очевидно, є проявом цитогенетичного впливу іонів нікелю як на клітинний метаболізм, так і на поділ клітин та їх диференціацію. Відомо [6], що нікель може впливати на формування фрагмопласту або ж взаємодіяти з ДНК і білками у ядрі.

Підвищення концентрації нікелю до 100 мкМ призводило до різкого зниження кількості прорегенованих листків і гальмування швидкості росту регенерантів, однак індекс толерантності моху з Червонограда виявився вищим, ніж зі Львова (табл. 1).

На концентрації 100 мкМ сульфату нікелю встановлено значне гальмування росту регенерантів, особливо з листків львівського зразка. Так, на 52-й день досліду ми спостерігали побуріння та припинення росту їх регенерантів. Незважаючи на те, що ріст регенеративної протонеми з листків моху червоноградського зразка відбувався досить повільно, з 88 листочків, поставлених на регенерацію, утворилося 3 гаметофори, які можна вважати стійкими до даної концентрації нікелю (табл. 2).

Встановлено, що нікель за концентрації 1 мМ повністю гальмував регенерацію ізольованих листків і призводив до хлорозу та швидкого некрозу клітин листової пластинки моху всіх зразків.

Отже, підвищення концентрації нікелю в агаризованому середовищі істотно знижувало активність регенерації ізольованих листків *F. hygrometrica*. Токсичний вплив нікелю пригнічував як ріст регенеративної протонеми, так і розвиток дернин та утворення гаметофорів

Таблиця 1

Вплив іонів нікелю на регенераційну здатність листків *Funaria hygrometrica*

Місцезростання зразків моху	Концентрація $\text{Ni}^{2+}$ , мкМ	Кількість листків, відібраних для регенерації	Кількість листків, які прорегенерували	Індекс толерантності, %
Заповідник (контроль)	0	95	95	100
Червоноград	30	95	93	97,9
Львів	30	100	76	76
Червоноград	100	88	18	20,5
Львів	100	84	7	8,3

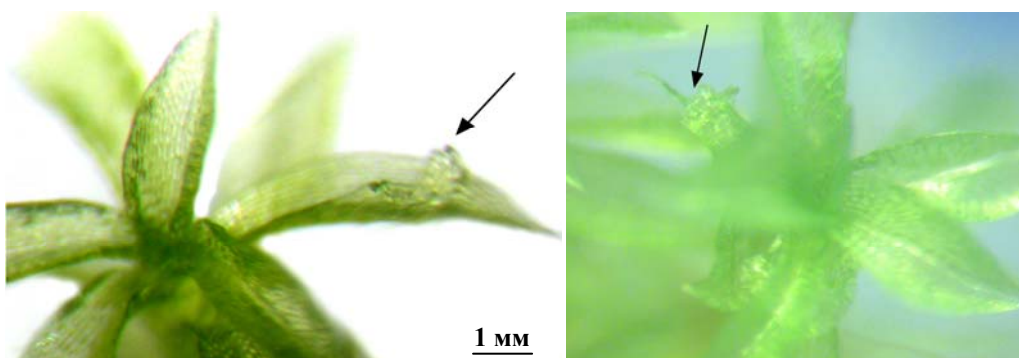


Рис. 2. Морфози листків гаметофорів *Funaria hygrometrica*, які утворилися на агаризованому середовищі з 30 мкМ  $\text{Ni}^{2+}$ .

Таблиця 2

Вплив  $\text{Ni}^{2+}$  на ріст і розвиток регенеративної протонемі *Funaria hygrometrica*,  $\text{M}\pm\text{m}$ 

Місце- зростання зразків моху	Концентрація $\text{Ni}^{2+}$ , мкМ	Загальна довжина регенерантів, мкм					
		на 7-й день	на 10-й день	на 14-й день	на 17-й день	на 33-й день	на 52-й день
Контроль	0	184,4±1,6	338,7±2,5	3 гаметофо- ри/дернину			
Червоноград	30	88,8±0,6	125,7±1,4	285,7±1,7	2 гаметофо- ри/дернину		
Львів	30	86,0±1,0	118,5±1,3*	204,3±3,0*	3 гаметофо- ри/дернину		
Червоноград	100	–	–	33,9±1,0	48,4±0,8	60,8±0,8	3 гаметофо- ри/дернину
Львів	100	–	–	17,0±0,2*	20,3±0,2*	33,6±0,6*	–

Примітка. \* достовірність різниці між дослідними зразками.  $P < 0,05$ .

(табл. 2). Отримані результати свідчать, що рослини з червоноградського зразка моху мають вищий рівень стійкості до токсичної дії металу: ріст протонемних ниток і утворення гаметофорів відбувалися швидше порівняно з регенерантами моху із львівського зразка (табл. 3).

Істотним для оцінки токсичної дії полютантів є не так їх вміст у субстраті, як їхня концентрація у клітинах рослин. У зв'язку з цим особливої актуальності набувають методи визначення вмісту важких металів у різних органах і клітинах мохів. Застосування цитохімічного методу з використанням диметилгліоксиму [7] дало можливість встановити розподіл нікелю у клітинах, поглинутого з інкубаційних розчинів та агаризованого середовища під час регенерації листків. Для аналізу відбирали лише цілі гаметофори і листки, тому що будь-яке пошкодження тканин могло призвести до спотворення характеру поглинання і перерозподілу іонів важкого металу внаслідок їх пасивного проникнення у мертві клітини раневої поверхні.

На підставі цитохімічного аналізу зафарбованих пагонів із листками встановлено, що у першу чергу іони нікелю інтенсивно поглинали клітини основи стебла та найстаріші листки. Якісна реакція на метал починала проявлятися на 7-й день інкубації пагонів. Отже, рослини *F. hygrometrica* досить повільно нагромаджують іони нікелю, порівняно з кадмієм та свинцем [2, 4]. Так, інтенсивне акумулювання іонів свинцю всією листовою пластинкою *F. hygrometrica* було виявлене цитохімічною реакцією з дитизоном після 1 год інкубації у 10 мкМ розчині нітрату свинцю [2].

Поглинання іонів нікелю, як і інших важких металів, відбувається внаслідок пасивної дифузії й активного транспорту. Експериментально встановлено [9], що у рослин переважає метаболічно активне поглинання  $\text{Ni}^{2+}$ . Інтенсивність пасивного поглинання зростає за високих концентрацій металу внаслідок його токсичної дії. Природа специфічних транспортерів  $\text{Ni}^{2+}$  досі не з'ясована, проте припускають, що нікель може проникати у клітини через активовані кальцієві канали [16].

Після інкубації у 30 мкМ розчині сульфату нікелю на окремих листових пластинках виявлено світло-рожеве забарвлення у результаті проникнення металу в апекс жилки та клітини основи листової пластинки, які активно діляться. Під впливом 100 мкМ розчину  $\text{Ni}^{2+}$  визначено найяскравіше забарвлення облямівки, центральної жилки, а та-

Таблиця 3

Вплив нікелю на швидкість росту регенеративної протонеми  
*Funaria hygrometrica*,  $M \pm m$ ,  $n=10$

Місце-зростання зразків моху	Концентрація $Ni^{2+}$ , мкМ	Швидкість росту протонемної нитки, мкм/добу					
		на 3-й день	на 6-й день	на 9-й день	на 13-й день	на 15-й день	на 32-й день
Червоноград	0	17,2±0,5	33,8±1,5	гаметофори			
Львів	0	16,2±0,7	27,7±1,3*	гаметофори			
Червоноград	30		7,0±0,6	14,7±0,8	22,3±1,1	гаметофори	
Львів	30		6,8±0,7	11,6±0,5*	19,8±1,0	гаметофори	
Червоноград	100				3,3±0,2	4,8±0,3	6,1±0,4
Львів	100				1,8±0,3*	2,2±0,1*	3,5±0,2*

**Примітка.** \*достовірність різниці між дослідними зразками.  $P < 0,05$ .

кож верхівки й основи листка. Листкова пластинка з 1 мМ розчину  $Ni^{2+}$  повністю зафарбовувалася в насичений малиново-бурий колір. Цікаво, що і на 30-й день інкубації пагонів та відокремлених листків у розчинах металу інтенсивність забарвлення та місця локалізації іонів металу не змінювалися.

Листки, які регенерували на середовищі з 30 мкМ нікелю, майже не зафарбовувалися під дією диметилглюксиму. На агаризованому середовищі з концентрацією 100 мкМ  $Ni^{2+}$  виявлено зафарбовані у червоний колір клітини жилки, верхівки, основи та окремих ділянок листкової пластинки. Листки, які не регенерували на середовищі із 1 мМ нікелю, зафарбовувалися в насичений червоно-бурий колір у ділянках локалізації металу: найінтенсивніше забарвлення диметилглюксиміну нікелю проявлялось у верхівці (особливо в апексі жилки) та основі листкової пластинки, менш зафарбовувалася облямівка листка. Клітини середньої частини листка були світло-рожевими. Отже, листки, які інкубували у розчині нікелю, а саме концентрацією 100 мкМ, інтенсивніше нагромаджували метал у клітинах порівняно з тими, що регенерували на середовищі з відповідною концентрацією сульфату нікелю (табл. 4).



Рис. 3. Листок *Funaria hygrometrica*, зафарбований диметилглюксимом після 7 днів інкубації у 1 мМ розчині сульфату нікелю.

Таблиця 4

Інтенсивність поглинання іонів нікелю у листках *Funaria hygrometrica*,  $M \pm m$ ,  $n=100$ 

Клітини	Екстинція, відн. од.		
	Після регенерації листків на середовищі з 100 мкМ $Ni^{2+}$	Після інкубації листків у розчині 100 мкМ $Ni^{2+}$	Після інкубації листків у розчині 1 мМ $Ni^{2+}$
Верхівки листка	0,360±0,04	0,860±0,03	0,760±0,03
Середньої частини листкової пластинки	0,175±0,06	0,530±0,07	0,310±0,06
Основи листка	0,310±0,06	0,620±0,08	0,650±0,04
Облямівки	0,285±0,09	0,560±0,02	0,460±0,05

Внаслідок застосування нового фотометричного методу можна стверджувати, що цитохімічне визначення нікелю у гаметофорах *F. hygrometrica* дає можливість виявити розподіл металу в клітинах пагона та листка моху. На підставі отриманих результатів встановлено, що, на відміну від іонів  $Cd^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  [5, 8, 25], більша частина абсорбованого нікелю не локалізувалася в апопласті, а проникла всередину клітини, в цитозоль (рис. 3). Локалізація  $Ni^{2+}$  переважно в протопластах клітин відрізнялася від внутрішньоклітинного розподілу свинцю і кадмію [2, 4, 5], іони яких переважно зв'язувалися з клітинними оболонками внаслідок вищої спорідненості до полігалактуранової кислоти. Якщо транспорт  $Cd^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  відбувався в основному по симпласту [5, 6, 8], то завдяки цитохімічній реакції з диметилглюксимом визначено, що нагромадження та розподіл  $Ni^{2+}$  у клітинах листкової пластинки здійснювався внаслідок симпластного транспорту.

Багато дослідників вважають [6, 19, 20, 27], що нікель нагромаджується у вакуолях у комплексі з цитратом, малатом, малоновною кислотою та гістидином, а також утворює аквакомплекси, при цьому у різних видів їх склад може змінюватися. Надходження  $Ni^{2+}$  у метаболічно малоактивний компартмент клітини є одним із неспецифічних механізмів детоксикації важких металів. Недавно у рослинах гіперакумулятора нікелю *Thlaspi goesingense* було виявлено спеціальні транспортні білки (TgMTPs), активація яких дає можливість накопичувати у вакуолях до 75% нікелю [19, 21]. Високий рівень експресії генів, які кодують локалізовані на тонопласті переносники та відповідають за транспорт металів (або їх комплексів) у вакуоль, може бути однією з причин стійкості рослин до дії важких металів.

Нагромадження великої кількості нікелю в апексі жилки (рис. 3) та верхівці листкової пластинки моху (табл. 4), мабуть, зумовлене посиленням транспортом  $Ni^{2+}$  по провідних тканинах листка та його транспіраційним потоком. Результати досліджень свідчать, що хоч іони деяких важких металів надходять у базальну частину органа з апікальної, у разі розподілу іонів нікелю *F. hygrometrica* його кількість в клітинах збільшується від базальної частини до апексу листкової пластинки.

1. Андреева И. В., Говорина В. В., Виноградова С. Б., Ягодин Б. А. Никель в растениях // Агрoхимия. 2001. № 3. С. 82–94.
2. Кияк Н. Я. Нагромадження та внутрішньоклітинний розподіл важких металів у мохах // Фізіолого-біохімічна оцінка дії техногенних факторів на рослини // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2002. Вип. 29. С. 93–101.
3. Лобачевська О. В. Вплив нікелю та фенолу на ріст і розвиток мохів // Вісн. Полтав. держ. пед. ун-ту. Сер. Екологія. Біол. науки. 2000. Вип. 4 (8). С. 4–11.

4. Маєвська С. М., Кардаш О. Р., Демків Л. О., Лобачевська О. В. Особливості поглинання іонів важких металів мохом *Plagiomnium undulatum* (Hedw.) Т. Кор. та його реакція на їх токсичну дію // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2000. Вип. 26. С. 134–141.
5. Серегин И. В., Иванов В. Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 4. С. 606–630.
6. Серегин И. В., Кожевникова А. Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 2. С. 285–308.
7. Серегин И. В., Кожевникова А. Д., Казюмина Е. М., Иванов В. Б. Токсическое действие и распределение никеля в корнях кукурузы // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 5. С. 793–800.
8. Серегин И. В., Пехов В. М., Иванов В. Б. Использование плазмолита для выяснения локализации свинца в корневых клетках // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 2. С. 317–319.
9. Тэмп Г. А. Никель в растениях в связи с его токсичностью // Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов / Под ред. Н.В. Алексеевой-Поповой. Л.: Лен-университет, 1991. С. 139–146.
10. Плохинский Н. А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.
11. Растения в экстремальных условиях минерального питания. Л.: Наука, 1983. 176 с.
12. Brown P. H., Welch R. M., Cary E. E. Nickel: A Micronutrient Essential for Higher Plants // Plant Physiol. 1987. Vol. 85. N 9. P. 801–803.
13. Dalton D. A., Evans H. J., Hanus F. J. Stimulation by Nickel of Soil Microbial Urease Activity and Urease and Hydrogenase Activities in Soybeans Grown in a Low-Nickel Soil // Plant Soil. 1985. Vol. 88. P. 245–258.
14. Dixon N. E., Gazzola C., Blakeley R. L., Zerner B. Jack-Bean Urease (E.C.3.5.1.5.3). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel // J. Am. Chem. Soc. 1975. Vol. 97. P. 4131–4133.
15. Eskew D. L., Welch R. M., Cary E. E. Nickel: An Essential Micronutrient for Legumes and Possibly All Higher Plants // Science. 1983. Vol. 222. P. 621–623.
16. Gabrielli R., Pandolfini T. Effect of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  on the Response to Nickel Toxicity in a Serpentine Endemic and Nickel-Accumulating Species // Physiol. Plant. 1984. Vol. 62. P. 540–544.
17. Gerendas J., Sattelmacher B. Influence of Ni Supply on Growth and Nitrogen Metabolism of *Brassica napus* L. Growth with  $NH_4NO_3$  or Urea as N Source // Ann. Res. 1993. Vol. 83. P. 65–71.
18. Kofler L. Contributin a l'etude biologique des mousses cultivees *in vitro*: germination de spores, croissance et development du protonema chez *Funaria hygrometrica* // Rev. Briol. et Lichenol. 1959. 28. 202 p.
19. Krämer U., Pickering I. J., Prince R. C. et al. Subcellular Localization and Speciation of Nickel in Hyperaccumulator and Non-Accumulator *Thlaspi* Species // Plant Physiol. 2000. Vol. 122. N 4. P. 1343–1353.
20. Lee J., Reeves R. D., Brooks R. R., Jaffre T. Isolation and Identification of a Citrato-Complex of Nickel from Nickel-Accumulating Plants // Phytochem. 1977. Vol. 16. P. 1503–1505.
21. Persans M. W., Nieman K., Salt D. E. Functional Activity and Role of Cation-Efflux Family Members in Ni Hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. N 17. P. 9995–10000.
22. Phytoremediation of Toxic Metals Using Plants to Clean Up the Environment / Eds Raskin I., Ensley B.D.N.Y. et al.: J. Wiley and Sons, Inc., 2000. 304 p.
23. Shaw A. J. Population ecology, population genetics, and microevolution // Bryophyte Biology / Eds. A.J. Shaw, B. Coffinet. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. P. 369–402.
24. Sengar R. S., Gupta S., Gautam M., Sharma A., Sengar K. Occurrence, Uptake, Accumulation and Physiological Responses of Nickel in Plants and its Effects on Environment // Res. J. of Phytochem. 2008. Vol. 2. N 2. P. 44–60.



25. *Wierzbicka M.* Ultrastructural Location of Lead in the Cell Walls of *Allium cepa* L. Roots // *Postępy Biologii Komórki*. 1984. Vol. 11. N 3–4. P. 509–512.
26. *Winkler R. G., Polacco J. C., Eskew D. L., Welch R. M.* Nickel Is Not Required for Apourese Synthesis in Soybean Seeds // *Plant Physiol*. 1983. Vol. 72. P. 262–263.
27. *Yang X. E., Baligar V. C., Foster J. C., Martens D. C.* Accumulation and Transport of Nickel in Relation to Organic Acids in Ryegrass and Maize Grown with Different Nickel Levels // *Plan Soil*. 1997. Vol. 196. P. 271–276.

#### CYTOCHEMICAL ANALYSIS OF NICKEL CONTENT IN CELLS OF MOSS GAMETOPHYTE *FUNARIA HYGROMETRICA* HEDW.

**U. Oksenjuk, O. Lobachevska**

*Institute of Ecology of the Carpathians of NAS of Ukraine  
11, Stefanyk St., Lviv 79000, Ukraine  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

The influence of nickel ions on the regenerative ability of leaves of moss *Funaria hygrometrica* Hedw. from various occurrences was investigated. It was established, that the increase of the metal concentration in the nutrient solution led to the inhibition of regenerants development and to the decreasing of the speed of their growth. On the basis of the results of Ni<sup>2+</sup> cytochemical determination we showed peculiarities of absorption and localization of nickel in cells after incubation of the moss leaves or their regeneration on agar nutrient medium with in 30, 100, 1000 μM NiSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

*Key words:* nickel, dimethyl glioxim, leaf, cytoplasm, vacuole, moss *Funaria hygrometrica*.

#### ЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ НИКЕЛЯ В КЛЕТКАХ ГАМЕТОФИТА МХА *FUNARIA HYGROMETRICA* HEDW.

**У. Оксенюк, О. Лобачевская**

*Институт экологии Карпат НАН Украины  
ул. Стефаника, 11, Львов 79000, Украина  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

Исследовано влияние ионов никеля на регенерационную способность листьев мха *Funaria hygrometrica* Hedw. с различных местопроизрастаний. Установлено, что при увеличении концентрации металла в среде подавлялось развитие регенерантов и снижалась скорость их роста. На основании результатов цитохимического определения Ni<sup>2+</sup> выявлены особенности его поглощения и локализации в клетках листьев мха после инкубации в 30, 100, 1000 мкМ растворах сульфата никеля и регенерации на агаризованной среде с соответствующими концентрациями металла.

*Ключевые слова:* никель, диметилглиоксим, листья, цитоплазма, вакуоль, мох *Funaria hygrometrica*.

Стаття надійшла до редколегії 10.03.09

Прийнята до друку 02.04.09